https://jmme.um.ac.ir/   DOI: 10.22067/jmme.2022.73523.1032

تأثیر ترکیب شیمیایی بر رفتار زینترینگ و خواص ریزساختاری، مکانیکی و بیولوژیکی کامپوزیت‌های هیدروکسی آپاتیت/شیشه بوراتی*

مقاله پژوهشی

زینب ابراهیمی کاهو [۱]   نگار اکرمی [۲]   مهرنوش قناد [۳]   سیمین نظرنژاد [۴]   سعید کارگذار [۵]   سحر ملازاده بیدختی [۶]

چکیده *در پژوهش حاضر، از روش احتراقی در محلول جهت سنتز ترکیب آمورف بوراتی زیست‌فعال استفاده شد. آنالیز FTIR ،XRD و PSA با هدف مشخصه‌یابی فازی، تشخیص پیوند و تعیین اندازه ذرات انجام شد. از آزمایش‌های MTT و Migration به منظور تعیین زیست‌سازگاری پودرها استفاده شد. پودر سنتز شده دارای ابعاد نانو، ساختار آمورف و تاثیر مثبت بر تکثیر و مهاجرت سلول‌ها است. ترکیب آمورف بوراتی با نانوذرات هیدروکسی آپاتیت به منظور ایجاد داربست‌های کامپوزیتی، در درصدهای وزنی متفاوت ترکیب شده و در دماهای ۶۰۰، ۶۵۰ و ۷۰۰ °C به مدت زمان‌های ۰/۵ و ۱ ساعت زینتر شدند. مطالعه الگوی تفرق اشعه ایکس به منظور تشخیص فازها و تست استحکام کششی قطری به منظور سنجش استحکام مکانیکی انجام شد. تصویربرداری FESEM از نمونه‌های شکسته شده در تست استحکام کششی قطری به منظور مشاهده‌ی مسیر ترک، میزان تخلخل و نحوه تاثیر شیشه بوراتی بر زینتر انجام شد. نمونه با wt.% ۲۰ هیدروکسی آپاتیت و wt.% ۸۰ شیشه بوراتی، زینتر شده در ۷۰۰ °C به مدت ۱ ساعت، دارای بالاترین استحکام به مقدار ۰/۰۲±۴/۸۷ است. آنالیز ICP-OES نمونه با wt.% ۲۰ هیدروکسی آپاتیت زینتر شده در ۷۰۰ °C به مدت ۱ ساعت بعد از ۷ روز غوطه‌وری در مایع شبیه سازی شده‌ی بدن، نشان دهنده افزایش رهایش یون در مقایسه با هیدروکسی آپاتیت خالص زینتر شده است. همچنین کنترل و کاهش رهایش یونی قابل ملاحظه شیشه بوراتی از طریق کامپوزیت و زینتر شدن در مشاهده شد. کامپوزیت ساخته شده دارای قابلیت پیوند با بافت نرم و سخت است.*

واژه‌های کلیدی هیدروکسی آپاتیت، شیشه زیست فعال، شیشه بوراتی، زینتر، داربست، کامپوزیت، نانوذره، استحکام کششی، رهایش یون.

مقدمه

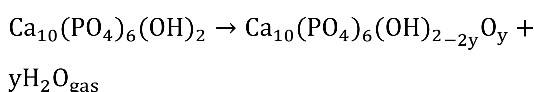
درمان عیب‌های استخوانی ناشی از برداشتن تومور و سوانح یکی از مشکلات مرسوم کلینیکی است و راه‌های متفاوتی برای این منظور و پیوند بافت پیشنهاد شده است. از جمله روش‌های پیشنهاد شده می‌توان به مواردی که ذکر می‌شوند اشاره نمود : ۱. آتوگرافت که در آن بافت مدنظر برای پیوند از بدن خود بیمار برداشته می‌شود، ۲. آلوگرافت که منبع بافت پیوند زده شده از بدن هم‌نوع بیمار است، ۳. زنوگرافت که بافت از بدنِ جاندار غیرهم‌نوعِ بیمار برداشته می‌شود. روش‌های ذکر شده دارای معایبی مانند: ایجاد زخم و جراحت، سالم نبودن محل دهنده‌ی بافت و کمبود بافت احیا کننده برای آتوگرافت؛ احتمال انتقال عفونت و پس زده شدن توسط سیستم ایمنی برای آلوگرافت و زنوگرافت هستند [1-3]. به منظور حل مشکلات گفته شده از روش‌های جدید مانند سنتزِ مواد سازگار با بدن از جمله سرامیک‌های زیست فعال بر پایه کلسیم فسفات، به خصوص هیدروکسی آپاتیت و قرار دادن آن‌ها در داخل بدن استفاده می‌شود. هیدروکسی آپاتیت ماده‌ای مناسب با ترکیب شیمیایی مشابه ۶۵ درصد بافت استخوان است [4] ,[2]. این ترکیب خاصیت استخوان‌زایی دارد و داربست متشکل از آن سطح مناسبی را برای رشد استخوان فراهم می‌کند. علی رغم خواص مناسب هیدروکسی آپاتیت، سرعت واکنش و جذب آن در دما (۳۷°C) و PH بدن کم است و با سرعت ترمیم بافت برابر نیست، بنابراین نرخ و سرعت پیوند کمی با استخوان دارد [6] ,[5] ,[3]. به علاوه استفاده آن در حالت بالک و داربست در مکان‌هایی که

* تاریخ دریافت مقاله ۱۴۰۰/۸/۱۷ و تاریخ پذیرش آن ۱۴۰۱/۲/۲۰ می‌باشد.

(۱) فارغ التحصیل مقطع کارشناسی، رشته مهندسی مواد و متالورژی، دانشگاه فردوسی مشهد.
(۲) دانشجوی مقطع کارشناسی ارشد، گرایش شناسایی و انتخاب مواد مهندسی، دانشگاه فردوسی مشهد.
(۳) دانشجوی مقطع کارشناسی ارشد، گرایش شناسایی و انتخاب مواد مهندسی، دانشگاه فردوسی مشهد.
(۴) دانشجو مقطع دکتری تخصصی مهندسی بافت، گروه علوم تشریح و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد.
(۵) استادیار مهندسی بافت، گروه علوم تشریح و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد.
(۶) نویسندهٔ مسئول، استادیار گروه مهندسی مواد و متالورژی، دانشکده مهندسی، دانشگاه فردوسی مشهد.
Email: mollazadeh.b@um.ac.ir

تحمل بار مطرح است توصیه نمی‌شود زیرا نیاز به دمای بالا برای زینتر شدن دارد و عملکرد مکانیکی آن مناسب نیست (مانند چقرمگی شکست پایین) [7-9].

دمای مناسب برای زینتر هیدروکسی آپاتیت معمولا بین ۱۱۵۰ ºC تا ۱۳۵۰ ºC است [10]. پدیده‌ی دی‌هیدروکسیل شدن هیدروکسی آپاتیت از دمای ۸۰۰ ºC آغاز می‌شود و تا ۱۳۵۰ ºC ادامه می‌یابد که با آزاد کردن H_2O گازی و تشکیل اکسی‌هیدروکسی آپاتیت به شرح واکنش زیر همراه است:



$$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 \rightarrow Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_{2-2y}O_y + yH_2O_{gas}$$

زمانی که در واکنش بالا y=۱ باشد، اوکسی آپاتیت تشکیل می‌شود ($Ca_{10}(PO_4)_6O$). اگر دما بالاتر از ۱۳۶۰ ºC باشد، تجزیه دمایی شروع شده و تری‌کلسیم فسفات (TCP) و تتراکلسیم فسفات (TTCP) تشکیل می‌شوند [11,12]. دی‌هیدروکسیله شدن هیدروکسی آپاتیت با آزاد شدن بخار آب همراه است. بخار آب در پروسه زینتر در داخل تخلخل‌های بسته به دام می‌افتد و ایجاد فشار می‌کند، این امر باعث افزایش حجم می‌شود و متراکم شدن در حین زینتر را سخت می‌کند. در ادامه با افزایش دما، تجزیه باعث تغییر خواص مکانیکی، شیمیایی و بیولوژیکی هیدروکسی آپاتیت می‌شود و زیست‌فعالی آن را کم می‌کند [13]. برای رفع مشکلات ذکر شده اعم از جذب کم در محیط بدن و خواص مکانیکی ضعیف، می‌توان از شیشه‌های زیست فعال در کنار هیدروکسی آپاتیت برای مهندسی بافت استفاده کرد، نتیجتا زیست‌فعالی ترکیب نهایی و پیوند آن با استخوان قابل کنترل و بهینه کردن خواهد بود. بعلاوه محصولات حل شده از شیشه‌های زیستی در مایع بدن خاصیت ضدمیکروبی دارند و این امر فرآیند ترمیم را سرعت میبخشد [2]. شیشه‌های توضیح داده شده دارای خاصیت پیوند با استخوان (Osteogenesis)، استخوان‌زایی، زیست‌فعالی و زیست تخریب پذیری بالایی هستند. برای ارتباط مناسب داربست با بافت نرم میتوان از شیشه‌های زیست فعال استفاده کرد زیرا باعث تحریک رشد و تکثیر سلول بافت نرم می‌شوند [14]. اولین شیشه زیست فعال 45S5 توسط Hench در سال ۱۹۶۹ اختراع شد که دارای ترکیب $46/1\ SiO_2, 24/4\ Na_2O, 26/9\ CaO, 2/6\ P_2O_5$ است (درصد مولی) [15] ,[2]. به تازگی تمرکز روی شیشه بوراتی به دلیل برتری‌های آن نسبت به 45S5 بیشتر شده است زیرا سرعت تبدیل کامل شیشه 45S5 به هیدروکسی آپاتیت در SBF (مایع شبیه‌سازی شده به مایع بدن) کمتر از شیشه بوراتی است و بعد از مدتی لایه غنی از سیلیکا روی سطح آن تشکیل می‌شود که از تخریب کامل و تبدیل کامل آن به هیدروکسی آپاتیت جلوگیری می‌کند. مکانیزم تبدیل شیشه بوراتی به هیدروکسی آپاتیت در بدن و یا SBF شامل واکنش بین Ca^{2+} آزاد شده از شیشه و PO_4^{3-} از محیط، در نتیجه تشکیل لایه کلسیم فسفاتِ آمورف و سپس تبدیل به هیدروکسی آپاتیت بلوری است [16]. علاوه بر دلایل گفته شده، زینتر شیشه 45S4 نیز مشکل‌تر است [17].

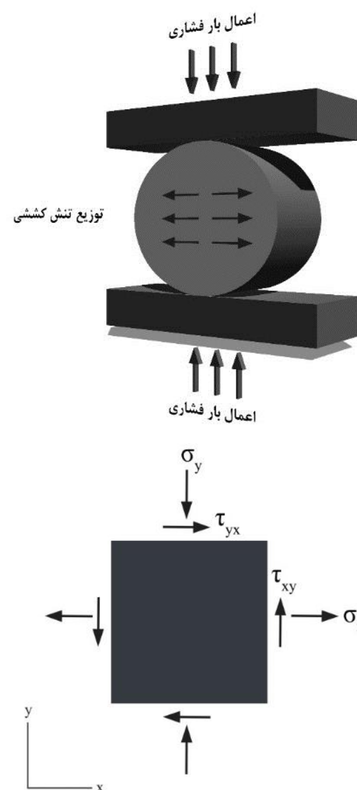
شیشه بوراتی 13-93B3 با ترکیب $6\ Na_2O, 8\ K_2O, 8\ MgO, 22\ CaO, 54\ B_2O_3, 2\ P_2O_5$ (درصد مولی) در مقایسه با شیشه 45S5 زیست‌سازگاری، تخریب‌پذیری و زیست‌فعالی بیشتری دارد و مانند 45S5 قابلیت ترمیم زخم را دارد. واکنش شیشه 13-93B3 با SBF، ۵ برابر سریع‌تر از واکنش شیشه 45S5 است [18]. شیشه بوراتی به دلیل عدد هم‌آرایی سه‌ی عنصر B در مقایسه با عنصر Si (که عدد هم‌آرایی ٤ دارد) نمی‌تواند به طور کامل یک شبکه سه بعدی تشکیل دهد، بنابراین شیشه بوراتی از دوام شیمیایی کمتری برخوردار است و از این رو سرعت انحلال بیشتری دارد [19].

در اثر انحلال شیشه سیلیکاتی در محیط بدن، سیلیسیوم آزاد می‌شود که باعث تشکیل استخوان می‌شود، در حالی که $B(OH)_3$ (یون بورات) و کلسیم آزاد شده از شیشه بوراتی باعث رگ‌زایی می‌شود [20] ,[18] ,[16].

در نتیجه از مهم‌ترین خواص شیشه بوراتی می‌توان به ارتباط بسیار مناسب با بافت نرم به علت واکنش پذیری بالا و خاصیت رگ‌زایی (ایجاد رگ‌های خونی) اشاره کرد. با توجه به تخریب کامل شیشه بوراتی در SBF مخصوصا در محیط استاتیک و ثابت در زمان اندک، نه تنها رهایش سریع و زیاد یون‌ها باعث تغییر PH در آن ناحیه و ممانعت از تکثیر سلولی می‌شود، بلکه رهایش سریع آنیون بورات ممکن است باعث مسمومیت شود [21] ,[17].

در این پروژه، نانوذرات هیدروکسی آپاتیت و شیشه 13-93B3 (نانوذرات به علت مرزدانه زیاد باعث چسبندگی و تکثیر سلولی زیادی می‌شوند و بدنه زینتر شده از آن‌ها به علت ریزدانه بودن، خواص مکانیکی بهتری دارد [22]) با درصدهای متفاوت وزنی با هم ترکیب و کامپوزیت می‌شوند و داربست متخلخل

(تخلخل تا حدی مناسب است زیرا مانند بافت استخوان است و بافت می‌تواند از میان آن رشد کند [23]. این مقدار برای بافت سخت بیشتر از ۵۰ درصد پیشنهاد شده [23].) ساخته می‌شود، تا ارتباط مناسب نه تنها با بافت سخت، بلکه با بافت نرم نیز برقرار شود. به علاوه با ترکیب کردن این دو ماده می‌توان رهایش یون و تخریب سریع شیشه بوراتی را کنترل کرد. و در نهایت می‌توان از این شیشه به عنوان کمک زینتر برای زینتر هیدروکسی آپاتیت استفاده کرد و از افت خواص مکانیکی بدنه زینتر شده توسط دی‌هیدروکسیله و تجزیه شدن جلوگیری کرد. در این تحقیق، ترکیب پودرها به صورت قرص درآمده و پرس شده‌اند و در آخر نیز زینتر شدند. تست استحکام کششی قطری و یا DTS (Diametral tensile strength) جهت ارزیابی خواص مکانیکی روی قرص‌ها، انجام شد. این تست برای ارزیابی استحکام کششی مواد ترد و دارای مقاومت کششی پایین به کار می‌رود. در این تست بار فشاری به دو سر قرص اعمال می‌شود و باعث ایجاد تنش کششی مطابق شکل (۱)، در صفحه قطری می‌شود [26–24].



شکل ۱ تست استحکام کششی قطری: شماتیک تست در سمت راست، و المان و توزیع تنش در شکل سمت چپ، نمایش داده شده‌اند

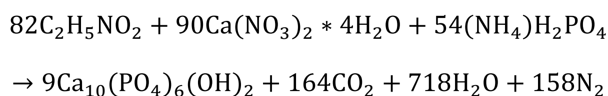
مواد و روش تحقیق

سنتز ترکیب آمورف بوراتی

به منظور سنتز احتراقی در محلول، تمامی مواد اولیه شامل نیترات کلسیم، نیترات منیزیم، نیترات پتاسیم، نیترات سدیم، اسید بوریک، اسید فسفریک و گلایسین از شرکت سیگما آلدریچ تهیه شد. به منظور سنتز ترکیب بوراتی آمورف ($6\ Na_2O, 8\ K_2O, 8\ MgO, 22\ CaO, 54\ B_2O_3, 2\ P_2O_5$)، ابتدا تمامی نیترات‌ها (نیترات منیزم، نیترات کلسیم، نیترات سدیم و نیترات پتاسیم) را در کمترین مقدار آب دی‌یونیزه در داخل بشر ریخته و روی استیرر در دمای محیط قرار داده تا به طور کامل در آب حل شوند. در بشر دیگری اسید بوریک، سوخت (گلایسین) و اسید فسفریک را نیز در داخل آب دی یونیزه ریخته و روی استیرر قرار داده تا محلولی همگن حاصل شود. در نهایت محتوای هر دو بشر را باهم ترکیب کرده و برروی هات پلیت با دماهای متفاوت قرار داده شدند، سپس به مقدار لازم زمان داده تا سنتز به طور کامل صورت گیرد.

سنتز هیدروکسی آپاتیت

سنتز هیدروکسی آپاتیت ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) توسط روش سنتز احتراقی در محلول انجام شد [27]. برای انجام واکنش، مواد اولیه به مقدار لازم طبق واکنش استوکیومتری زیر برداشته شد.



$$82C_2H_5NO_2 + 90Ca(NO_3)_2 * 4H_2O + 54(NH_4)H_2PO_4 \rightarrow 9Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 164CO_2 + 718H_2O + 158N_2$$

ابتدا مقدار لازم کلسیم نیترات ٤ آبه ($Ca(NO_3)_2*4H_2O$) و گلایسین ($C_2H_5NO_2$) به آب دی یونیزه اضافه سپس روی استیرر مغناطیسی گذاشته می‌شود و زمان داده می‌شود تا مواد در آب حل شوند. در مرحله بعد نیتریک اسید (HNO_3) به محلول اضافه می‌شود تا PH محلول به میزان ۱-۰ برسد. در قدم آخر، مونوآمونیوم فسفات ($(NH_4)H_2PO_4$) به محلول افزوده می‌شود و زمان می‌دهیم تا محلول همگن شود. محلول به بوته منتقل شده و هیدروکسی آپاتیت جامد روی هات‌پلیت با دمای ۳۳۰ ^oC در طی فرآیند سنتز احتراقی در محلول در زیر هود و اتمسفر اتاق، تشکیل می‌شود.

تهیه کامپوزیت هیدروکسی آپاتیت / شیشه بوراتی

هر دو ترکیب (هیدروکسی آپاتیت و شیشه بوراتی) به صورت جداگانه در هاون آگات نرم‌ساب شدند تا پودرهای نانوذره به دست آید. سپس پودرها با درصد وزنی‌های متفاوت، مطابق جدول (۱) ترکیب شدند (وزن کل ۰/۰۸ گرم بوده است).

به منظور عملکرد به عنوان چسب و ایجاد تخلخل در نمونه‌های کامپوزیتی ، از محلول wt.% ۳/۳۳ ژلاتین استفاده شد. جهت آماده سازی این محلول، ۱ گرم ژلاتین در ۳۰ گرم یا ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و پس از آن در ۵۰ ºC حرارت داده شد تا محلولی همگن حاصل شود. به ترکیب پودرها ۰/۰۲ گرم از محلول ژلاتین افزوده شد. سپس ترکیب‌ها در قالبی استوانه‌ای به قطر ۱ cm و فشار ۱/٦۵ MPa پرس می‌شوند تا به صورت قرص دربیایند. ۰/۰۱ گرم از محلول wt.% ۳/۳۳ ژلاتین به سطوح پشتی و جلوی قرص‌های کامپوزیتی اضافه شد. سپس جهت ایجاد استحکام، قرص‌ها در دمای ºC ۷۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در آذر کوره تحت عملیات حرارتی قرار گرفتند. پس از آن، نمونه‌ها از کوره خارج و در اتمسفر محیط سرد شدند. در گام بعد، به منظور بررسی زینتر پذیری کامپوزیت‌ها در شرایط متفاوت، ترکیب‌ها با درصد وزنی متفاوت هیدروکسی آپاتیت با توجه به توضیحات و الگوی تفرق اشعه ایکس کامپوزیت‌های عملیات حرارتی شده در ºC ۷۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه، انتخاب شدند و صورت قرص خام تهیه و سپس به توضیح جدول (۲) زینتر شدند

جدول ۱ ترکیب کامپوزیت‌های شیشه/ هیدروکسی آپاتیت

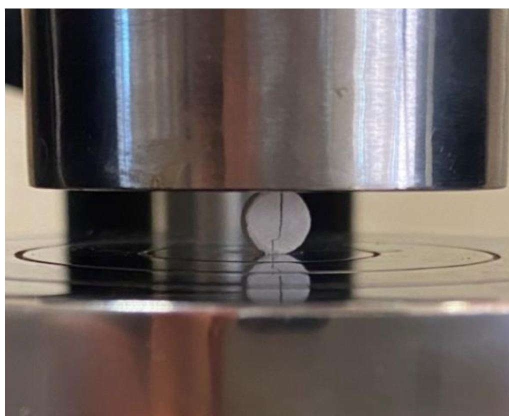
نام نمونه	درصد وزنی هیدروکسی آپاتیت	درصد وزنی شیشه بوراتی
H۱۰	۱۰	۹۰
H۲۰	۲۰	۸۰
H۳۰	۳۰	۷۰
H٤۰	٤۰	٦۰
H۵۰	۵۰	۵۰
H٦۰	٦۰	٤۰
H۷۰	۷۰	۳۰
H۸۰	۸۰	۲۰
H۹۰	۹۰	۱۰
H۱۰۰	۱۰۰	۰

جدول ۲ شرایط زینتر و نحوه کدگذاری ترکیب‌های انتخاب شده

دما و زمان زینتر نمونه	ºC ٦۰۰ و ۱ ساعت	ºC ٦۵۰ و ۰/۵ ساعت	ºC ٦۵۰ و ۱ ساعت	ºC ۷۰۰ و ۰/۵ ساعت	ºC ۷۰۰ و ۱ ساعت
۲۰H	۲۰H-٦۰۰-۱	۲۰H-٦۵۰-۰/۵	۲۰H-٦۵۰-۱	۲۰H-۷۰۰-۰/۵	۲۰H-۷۰۰-۱
۵۰H	۵۰H-٦۰۰-۱	۵۰H-٦۵۰-۰/۵	۵۰H-٦۵۰-۱	۵۰H-۷۰۰-۰/۵	۵۰H-۷۰۰-۱
۸۰H	۸۰H-٦۰۰-۱	۸۰H-٦۵۰-۰/۵	۸۰H-٦۵۰-۱	۸۰H-۷۰۰-۰/۵	۸۰H-۷۰۰-۱
۱۰۰H	۱۰۰H-٦۰۰-۱	۱۰۰H-٦۵۰-۰/۵	۱۰۰H-٦۵۰-۱	۱۰۰H-۷۰۰-۰/۵	۱۰۰H-۷۰۰-۱

مشخصه یابی،آنالیز فازی، ارزیابی ریزساختار، تست مکانیکی، بقا و مهاجرت سلولی

به منظور آنالیز فازی نمونه‌های کامپوزیتی، مطالعه‌ی الگوی پراش اشعه ایکس (XRD) (دستگاه: X' Pert PW 3040/60) انجام شد. زاویه تفرق ۷۰°-۱۵ = 2θ بود. میزان افزایشِ زاویه در تست XRD در هر قدم ۰/۰۲ درجه بوده است. تست مکانیکی استحکام کششی قطری با سرعت بارگذاری فک ۰/۲ میلیمتر بر دقیقه انجام شد تا نمونه‌های هیدروکسی آپاتیت و کامپوزیت هیدروکسی آپاتیت/شیشه دچار شکست شوند (شکل ۲) سپس مشاهده‌ی ریزساختار و مسیر رشد ترک، توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (FESEM) با ولتاژ شتاب دهنده ۱۵ کیلوولت (مدل دستگاه: TESCAN، MIRA3) انجام شد. به این منظور سطح نمونه‌ها با لایه نازک طلا برای ایجاد رسانایی، پوشش داده شدند. به هدف اندازه‌گیری زیست فعالی کامپوزیت‌ها توسط ایجاد فازهای حاوی کلسیم و میزان تمایل ایجاد پیوند آن‌ها با استخوان و بافت نرم، نمونه‌ها در مایع شبیه‌ساز بدن (SBF) به مدت هفت روز به روش کوکوبو غوطه‌ور شدند تا فازهای حاوی کلسیم مشخص شوند [28]. غوطه‌وری در دستگاه شیکر انکوباتور (shaker incubator) با دمای ۳۷ °C انجام شد. طیف سنجی پلاسمای جفت شده‌ی القایی (ICP-OES, Spectro Arcos, Germany) به منظور مشخص کردن غلظت یون‌های Ca^{2+}، K^{+}، Mg^{2+}، PO_4^{3-}، BO_3^{3-} و Na^{+} در مایع شبیه ساز بدن بعد از برداشتن نمونه‌ها، انجام شد. نمونه‌های جدا شده توسط آنالیز XRD (Explorer GNR, Italy) به منظور مشخص کردن فازهای تشکیل شده پس از غوطه‌وری، در زوایای ۸۰°-۱۵ = 2θ مورد مطالعه قرار گرفتند. به منظور مشخصه‌یابی ترکیب آمورف بوراتی، طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) در محدوده ۲۴۰۰-۶۰۰ عدد موج (cm^{-1}) به منظور تشخیص گروه‌های عاملی ایجاد شده در پروسه سنتز انجام شد (Thermo Nicolet, AVATAR 370 FT-IR). آنالیز سایز ذرات به هدف اندازه گیری سایز ذرات شیشه بوراتی انجام شد (CORDOUAN, Vasco3)، به منظور انجام تست ۰/۰۱ گرم پودر در آب مقطر توسط دستگاه آلتراسونیک حل شد.



شکل ۲ شکست نمونه در طی تست استحکام کششی قطری

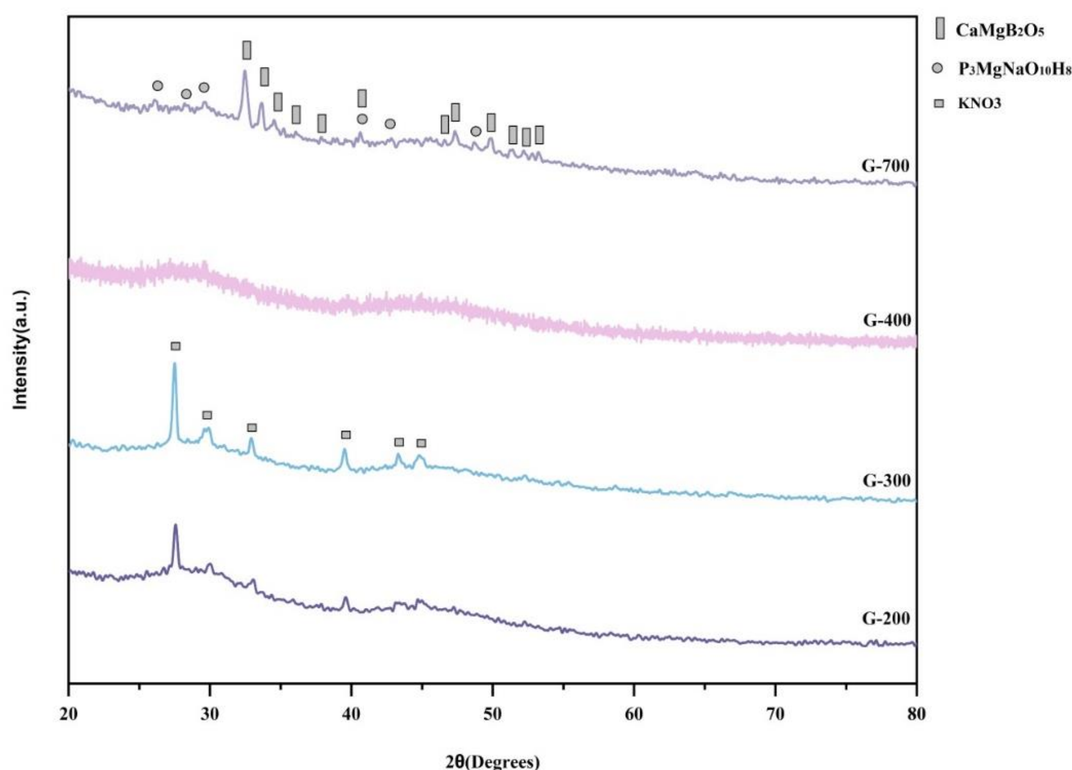
تأثیر ترکیب آمورف بوراتی بر بقا، رشد و تکثیر سلول‌های 3T3 (سلول‌های فیبروبلاست موش، تهیه شده از انستیتو پاستور ایران) توسط آزمایش رنگ سنجی ام تی تی ((۳-(٤ و ٥-دی‌متیل-۲-تیازولیل)-۲ و ٥-دی‌فنیل تترازولیوم برمید)) انجام شد (Sigma-Aldrich, USA). تعداد ۵۰۰۰ سلول در هر خانه در پلیت ۹٦ خانه‌ای (SPL Lifesciences, Korea) در محیط کشت DMEM با گلوکز بالا که با ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) و ۱٪ پنی‌سیلین/استرپتومایسین (Gibco, USA) تقویت شده است، کشت شدند. بعد از ٢٤ ساعت، محیط کشت، توسط محیط کشت آماده شده از افزودن پودر ترکیب آمورف بوراتی (استریل شده با فرابنفش) به میزان ۰/۵، ۱ و ۲/۵ میلی‌گرم به ۱ میلی‌لیتر از DMEM با گلوکز بالا، تقویت شده با ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) و ۱٪ پنی‌سیلین/استرپتومایسین، جایگزین شد. سپس انکوباسیون به همراه تکان دادن به مدت ۳ ساعت با سرعت ۱۰۰ دور بر دقیقه انجام شد. بعد از ٢٤ ساعت ام‌تی‌تی (۵ میلی‌گرم بر لیتر) افزوده شد و در ۳۷ °C و ۵ ٪ کربن دی‌اکسید انکوباسیون به مدت ٤ ساعت انجام شد. سپس تمام محیط کشت جدا شد و با دی‌متیل سولفوکساید (Sigma-Aldrich, USA) جایگزین شد و پلیت به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۲۰ دور بر دقیقه در تاریکی تکان داده شد. در نهایت چگالی نوری خانه‌های پلیت با دستگاه میکروپلیت ریدر (Synergy HT, BioTek, USA) در ۵۷۰ با طول موج مرجع ٦۳۰ نانومتر مشخص شد. همچنین تأثیر محتوای حاوی ترکیبات امورف بوراتی بر پویایی سلول های 3T3 ارزیابی شد. به طور خلاصه، در پلیت ٢٤ خانه‌ای تعداد 10^4 سلول در

هر خانه، در محیط DMEM-F12 حاوی ٪۵ FBS و ٪۱ pen/strep کشت داده شد. سلول‌ها به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ ºC انکوبه شدند تا لایه‌ای از سلول‌ها به دست آید. سپس لایه سلولی با نوک پیپت به صورت مستقیم خراشیده شد و تصاویر زمان صفر در زیر میکروسکوپ کانفوکال گرفته شد. پس از آن، محیط حاوی ترکیبات آمورف بوراتی حاوی ٪۱ FBS و ٪۱ pen/strep به هر خانه اضافه شد و در دمای ۳۷ ºC به مدت ۲٤ ساعت انکوبه شد. مقدار مهاجرت سلولی با مقایسه تصاویر گرفته شده در زمان ۰ و ۲٤ ساعت با استفاده از نرم افزار Image J (NIH، ایالات متحده آمریکا) اندازه گیری شد.

نتایج و بحث

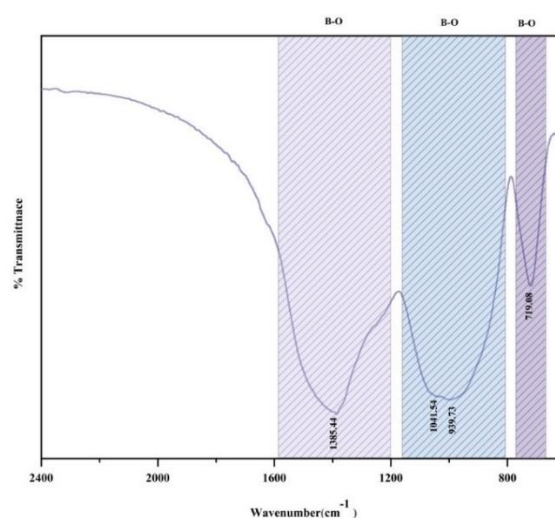
ترکیبات آمورف بوراتی

مطالعه الگوی پراش اشعه ایکس (XRD). در شکل ۳ الگوی XRD نمونه های سنتز شده در دماهای oC ۲۰۰، oC ۳۰۰ و oC ٤۰۰ پس از فرآیند کلسیناسیون در دمای oC ۷۰۰ نمایش داده شده است. در نمونه‌های سنتز شده در دماهای ºC ۲۰۰ و ºC ۳۰۰ شاهد پیک‌هایی با شدت نسبتا زیاد مربوط به ماده اولیه پتاسیم نیترات (کد مرجع: ٤٦۲۳-۲۱۰-۹٦) بوده‌ایم که احتمال می‌رود با توجه به دمای تجزیه بالاتر این نیترات نسبت به بقیه نیترات‌ها که حدود ºC ٤۰۰ می‌باشد [29] و از طرفی دیگر حلالیت کمتر این نیترات نسبت به بقیه نیترات‌ها درآب که در نتیجه باعث برهم خوردن هموژنیته نیز می‌شود، بتوان این نتایج را توجیه نمود. با افزایش بیشتر دما و در دمای ºC ٤۰۰ به دلیل غلبه‌ی دما بر عدم وجود هموژنیته و همچنین رسیدن به دمای تجزیه تمامی نیترات‌ها، شاهد الگو XRD کاملا آمورف در این نمونه بوده‌ایم. همانطور که گراف G700 در شکل ۳ نشان می‌دهد نگهداری نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای ºC ۷۰۰ منجر به تبلور فاز CaMgB2O5 [30] (کد مرجع: ۰۷۲۳-۹۰۱-۹٦) به همراه پیک‌هایی با شدت کم از فاز P3MgNaO10H8 (کد مرجع: ۹٦-۲۲۰-۱۷٥۹)، شده است.



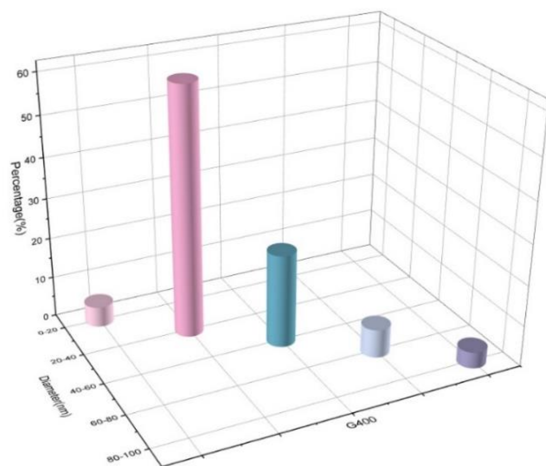
شکل ۳ الگو تفرق اشعه ایکس نمونه‌های سنتز شده.

مطالعه طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR).
مطالعات پیشین در رابطه با ترکیبات بوراتی چند جزئی حاوی اکسیدهای قلیایی و قلیایی خاکی، نشان دهنده تمایل اتم بور به پیوند با سه یا چهار اتم اکسیژن و در نتیجه تشکیل واحدهای ساختاری BO_3 و BO_4 می‌باشد. شکل (٤) گراف مربوط به طیف سنجی FTIR ترکیب بوراتی آمورف سنتز شده در دمای ^{o}C ٤٠٠ را نشان می‌دهد. همانطور که در شکل (٤) نشان داده شده است این گراف شامل سه منطقه مجزا می‌باشد. منطقه بین cm^{-1} ٦٠٠–٨٠٠ که به ارتعاشات خمشی گروه‌های مختلف بورات (BO_3 و BO_4) اختصاص داده می‌شود. باندهای بین cm^{-1} ٨٠٠–١٢٠٠ مربوط به ارتعاش کششی B-O واحدهای BO_4 است. و در نهایت منطقه بین cm^{-1} ١٢٠٠– ١٦٠٠ به دلیل ارتعاش کششی نامتقارن B-O از واحدهای BO_3 است [31]. در نتیجه به وضوح شاهد باندهای B-O در گراف‌های FTIR خواهیم بود.



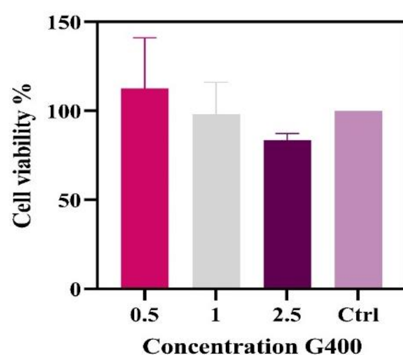
شکل ٤ گراف طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه‌ی نمونه سنتز شده در دمای ^{o}C ٤٠٠

مطالعه بررسی اندازه ذرات (PSA). توزیع اندازه ذرات پودرهای تهیه شده در دمای ^{o}C ٤٠٠ ، در شکل (٥) نشان داده شده است. این نتایج نشان می‌دهد که به دلیل استفاده از روش سنتز ذکر شده، تمام ذرات سنتز شده دارای توزیع اندازه ذرات بسیار ریز و در حد نانومتری هستند. همچنین همانطور که در شکل (٥) نمایش داده شده است بیشتر اندازه ذرات در بازه‌ی ٢٠ تا ٤٠ نانومتر هستند.



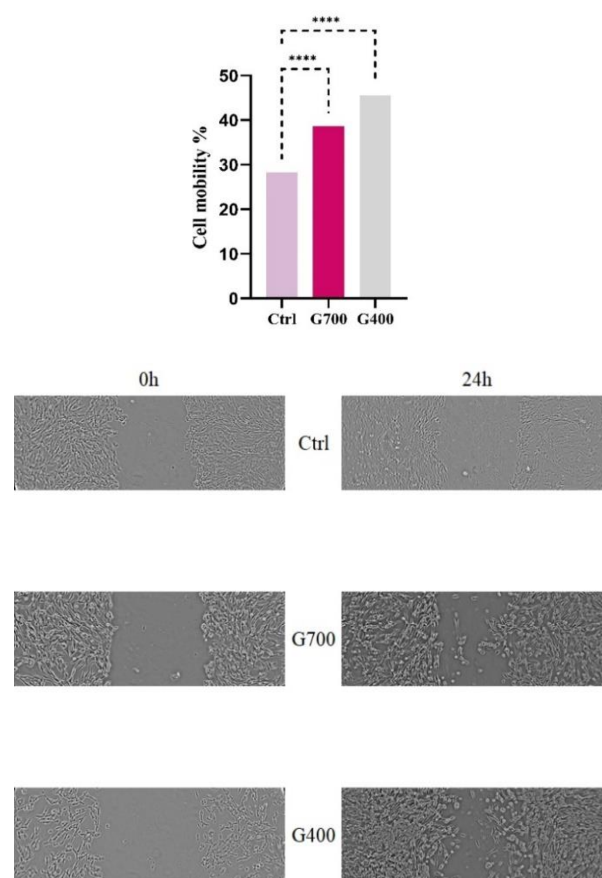
شکل ٥ نمودار بررسی اندازه ذراتِ نمونه سنتز شده در دمای ^{o}C ٤٠٠

مطالعه بررسی سمیت (MTT). در شکل (٦) نتایج تست MTT برای نمونه سنتز شده در دمای ٤٠٠ oC نمایش داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که پودرهای تهیه شده در غلظت‌های مختلف ٠/٥، ١ و ٢,٥ میلی‌گرم/میلی‌لیتر پس از ١ روز، هیچ اثر مخربی بر روی رشد و تکثیر رده سلول‌های 3T3 (سلول‌های فیبروبلاست موش) ندارند و در غلظت‌های ٠/٥ و ١ میلی‌گرم/میلی‌لیتر شاهد تکثیر بیشتر سلول‌ها نسبت به گروه کنترل به دلیل وجود یون‌های درمانی مانند کلسیم، بور و ... بوده‌ایم [32]. علاوه بر این باتوجه به این که روش سنتز ذکر شده باعث به وجود آمدن ذراتی با ابعاد نانو شده است و نانوذرات دارای سطح ویژه بالاتر، بار سطحی بالاتر و رهایش سریع‌تر نیز هستند، می‌توانند عملکرد بیولوژیکی بهتری را از خود نشان دهند [33]. عملکرد بیولوژیکی بهتر به معنی تشکیل سریع‌تر لایه هیدروکسی آپاتیت و همچنین خاصیت رگزایی ناشی از رهایش عنصر بور است [16].



شکل ٦ نتایج تست MTT برای نمونه سنتز شده در دمای ^{o}C ٤٠٠.

مطالعه تست مهاجرت سلولی (Migration). شکل (۷) پتانسیل مهاجرت سلول‌های 3T3 انکوبه شده با محتوای حاوی ترکیبات آمورف بوراتی را پس از ۲٤ ساعت نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود، سلول‌های 3T3 گروهِ کنترل نرخ مهاجرت ۲۸/۲٤ ٪ را پس از ۲٤ ساعت نشان دادند، در حالی که میزان پویایی سلول‌ها مربوط به گروه‌های G700 و G400 به ترتیب ۳۸/۵۹ و٤۵/۵٦٪، ثبت شد.



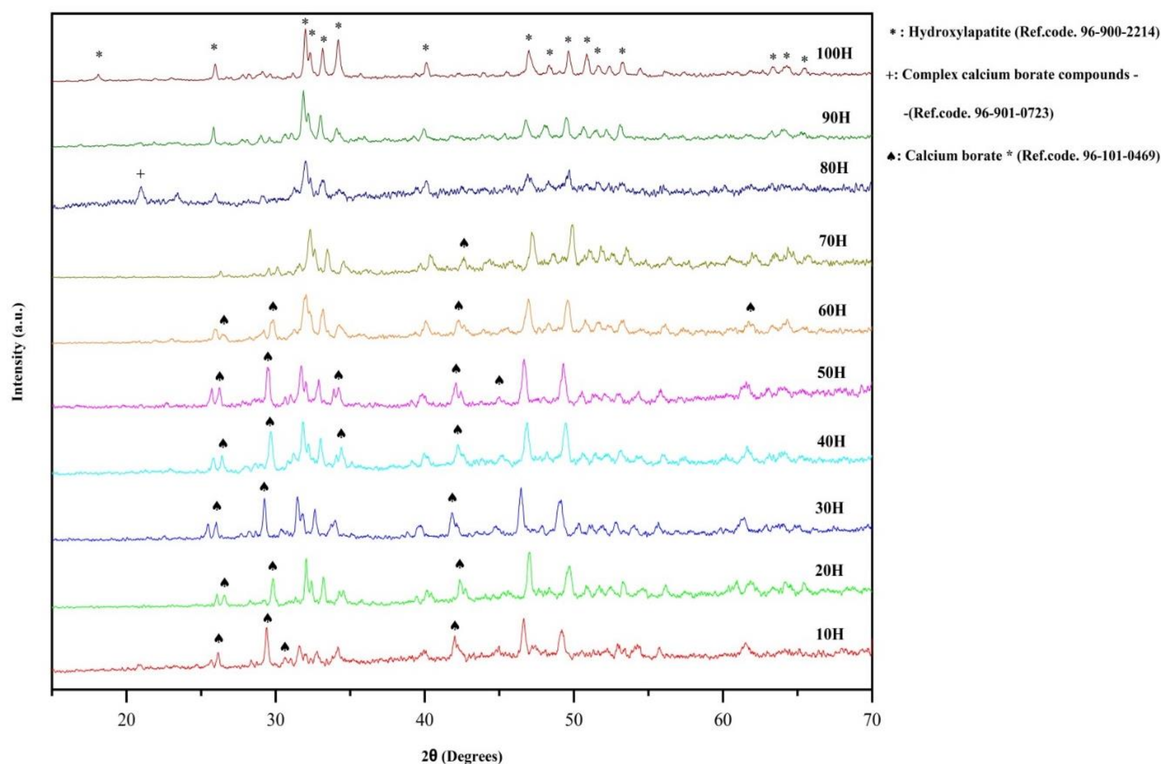
شکل ۷ نتایج تست Migration برای نمونه‌های G400 و G700

کامپوزیت هیدروکسی آپاتیت/شیشه بوراتی

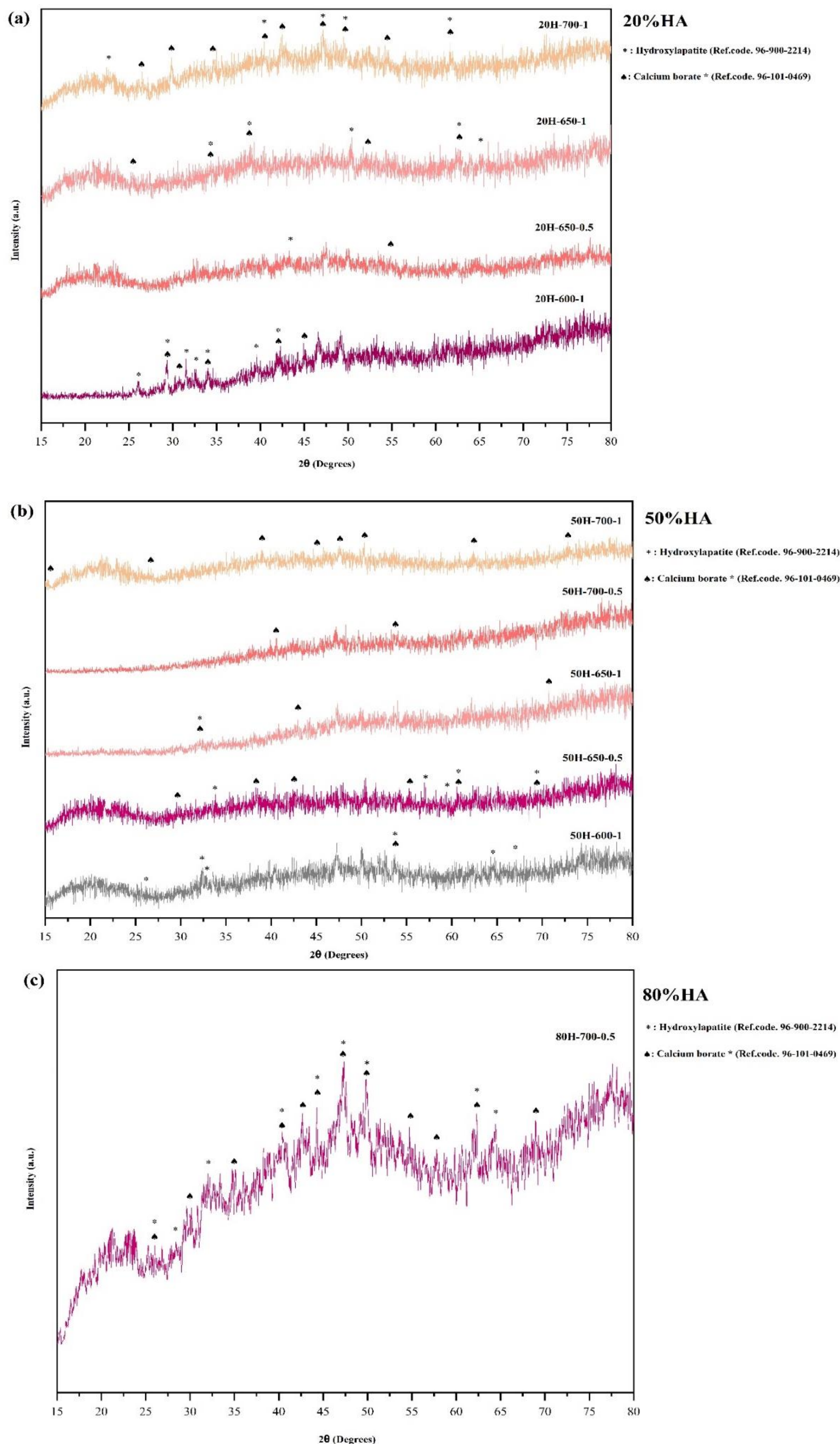
مطالعه الگوی پراش اشعه ایکس (XRD). به منظور انتخاب و دستیابی به کامپوزیت با استحکام مکانیکی بالا، ریزساختار مناسب و قابلیت زینتر شدن در زمان کم، پودرهای هیدروکسی آپاتیت و آمورف بوراتی (به عنوان افزودنی و کمک زینتر) wt.% ۱۰۰-۰ با هم ترکیب شدند و تحت عملیات حرارتی (ºC ۷۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه) قرار گرفتند. نتایج آنالیز فازی XRD در شکل (۸) ارائه شده است. شکل بیانگر این امر است که هرچه ترکیب بوراتی در کامپوزیت بیشتر شده است، تجزیه آن فاز نیز بیشتر بوده و باعث ایجاد بورات کلسیم شده است. پیک بورات کلسیم در ۲٦°، ۳۰، ٤۲، ٦۲ = 2θ در نمونه‌های ۱۰H تا ۷۰H قابل مشاهده است، شدت این پیک‌ها با افزایش درصد وزنی شیشه بوراتی بیشتر می‌شود و در مقابل شدت پیک‌های هیدروکسی آپاتیت کمتر می‌شود. در نمونه ۱۰H تا ۷۰H، تجزیه شیشه بیشتر بوده است. این امر را می‌توان از مقایسه الگوی پراش نمونه‌های ۱۰H تا ۷۰H با الگوی نمونه ۸۰H دریافت. الگوی نمونه ۸۰H در زاویه ٤۲ و ۲٦ درجه پیکی ندارد، اما این پیک‌ها در نمونه‌های ۱۰H تا ۷۰H مشاهده می‌شود که نشانه تبلور کلسیم بورات به میزان بالاتر است. در نمونه ۸۰H پیکی که نشانگر ترکیبات پیچیده‌ی بورات کلسیم است، در ۲۱° = 2θ مشاهده می‌شود. همچنین در نمونه ۱۰H، فاز آمورف بوراتی به میزان بالایی با توجه به پیک‌ها تجزیه شده است که مطلوب نمی‌باشد. با توجه به نتایج به دست آمده از الگوی XRD، نمونه‌ها با wt.% ۲۰ و wt.% ۸۰ هیدروکسی آپاتیت برای بررسی در تحقیق حاضر انتخاب شدند. به منظور مشاهده اثر شیشه بر روند زینتر، نمونه‌های کامپوزیتی که حاوی wt.% ۱۰۰ و wt.% ۵۰ هیدروکسی آپاتیت هستند (در wt.% ۵۰ هیدروکسی آپاتیت فاز زمینه هیدروکسی آپاتیت نمی‌باشد)، نیز انتخاب شدند. دلیل این انتخاب زینتر نشدن هیدروکسی آپاتیت خالص در ºC ۷۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه است [11].

نتایج الگوی تفرق اشعه ایکس نمونه‌های کامپوزیت شده در دماها و زمان‌های متفاوت که در جدول (۲) توضیح داده شده در شکل (۹) نشان داده شده است. در نمونه‌ها با wt.% ۲۰ هیدروکسی آپاتیت (گراف a)، در نمودار ۱-٦۰۰-۲۰H ، تبلور و پیک‌های هیدروکسی آپاتیت و فاز غیر سمی کلسیم بورات را داریم که نشان دهنده‌ی تجزیه شیشه است [34]. در نمونه‌های حاوی wt.% ۲۰ هیدروکسی آپاتیت، تعدا کم پیک‌های هیدروکسی آپاتیت می‌تواند به علت مقدار کم آن باشد. در نمودار ۲۰H-۰-٦۵۰/۵ و ۱-٦۵۰-۲۰H شدت پیک‌ها نسبت به نمودار ۲۰H-۱-٦۰۰ و ۱-۷۰۰-۲۰H کمتر است که این امر می‌تواند به دلیل فراگرفته شدن فاز متبلور هیدروکسی آپاتیت توسط جریان ویسکوز شیشه آمورف [35] (دمای پایداری شیشه مورد استفاده در این تحقیق حدود ºC ٦۰۰ است)، به هنگام بالا رفتن دما تا ºC ٦۵۰ باشد. افزایش شدت و تعداد پیک‌های کلسیم بورات در

نمودار ۱-۷۰۰-20H نسبت به دو نمودار ۰/۵-۶۵۰-20H و ۱-۶۵۰-20H ممکن است نشان دهنده‌ی تبلور بیشتر شیشه است. در نمونه‌های حاوی wt.% ۵۰ هیدروکسی آپاتیت (گراف b)، در نمودار ۱-۶۰۰-50H هر دو فاز کلسیم بورات و هیدروکسی آپاتیت متبلور شده‌اند. با ثابت گرفتن زمان و بالا بردن دما تا ºC ۶۵۰ (نمودار ۱-۶۰۰-50H و ۱-۶۵۰-50H)، شدت پیک‌ها کم شده است. این امر ممکن است به دلیل احاطه شدن فاز کریستالی توسط شیشه آمورف و یا کاهش بلورینگی فاز شیشه باشد (شیشه سیال ویسکوز شده و دور فاز کریستالی را گرفته است و به علت سیال ویسکوز شدن و در پی آن انجماد سریع، شیشه آمورف شده است و تبلور کمتری نسبت به نمودار ۱-۶۰۰-50H داشته). از مقایسه نمودار ۰/۵-۶۵۰-50H و ۱-۶۵۰-50H تاثیر زمان مشخص می‌شود (در دمای ثابت) که همانند توضیح قبل باعث کاهش شدت پیک شده است. مقایسه نمودار ۰/۵-۶۵۰-50H و ۰/۵-۷۰۰-50H تاثیر دما را در زمان ثابت مشخص می‌کند که افزایش دما باعث کاهش شدت پیک‌ها به دلیل کم شدن بورینگی شیشه و احاطه شدن فاز کریستالی توسط شیشه می‌شود (با بالا رفتن دما شیشه سیال ویسکوز شده و دور فاز کریستالی را فراگرفته). در نمونه با wt.% ۸۰ هیدروکسی آپاتیت (گراف c)، تاثیر افزایش درصد وزنی هیدروکسی آپاتیت نسبت به دو گراف قبل (b و a) با افزایش تعداد و شدت پیک‌های هیدروکسی آپاتیت مشخص می‌شود. از مقایسه این نمودار با نمودار ۰/۵-۷۰۰-50H در گراف b می‌توان به این امر پی برد. احتمال زینتر و تجزیه شدن نمونه‌ها با wt.% ۸۰ هیدروکسی آپاتیت در دماهای زیر ºC ۷۰۰ بسیار کم است و به همین علت این دما برای مطالعه انتخاب شده است. الگوی تفرق اشعه ایکس برای نمونه‌های حاوی wt.% ۱۰۰ هیدروکسی آپاتیت مطالعه نشده، زیرا این نمونه‌ها در زیر ºC ۱۰۰۰ تجزیه و زینتر نمی‌شوند [11].

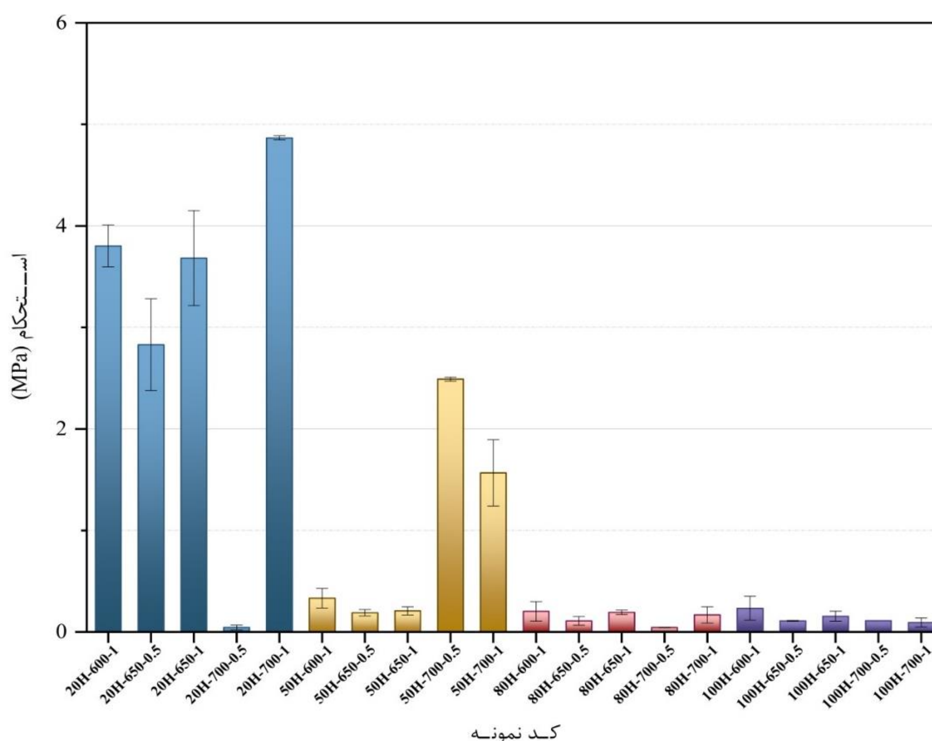


شکل ۸ الگوی تفرق اشعه ایکس، دما و زمان زینتر به ترتیب ºC ۷۰۰ و ۱۵ دقیقه



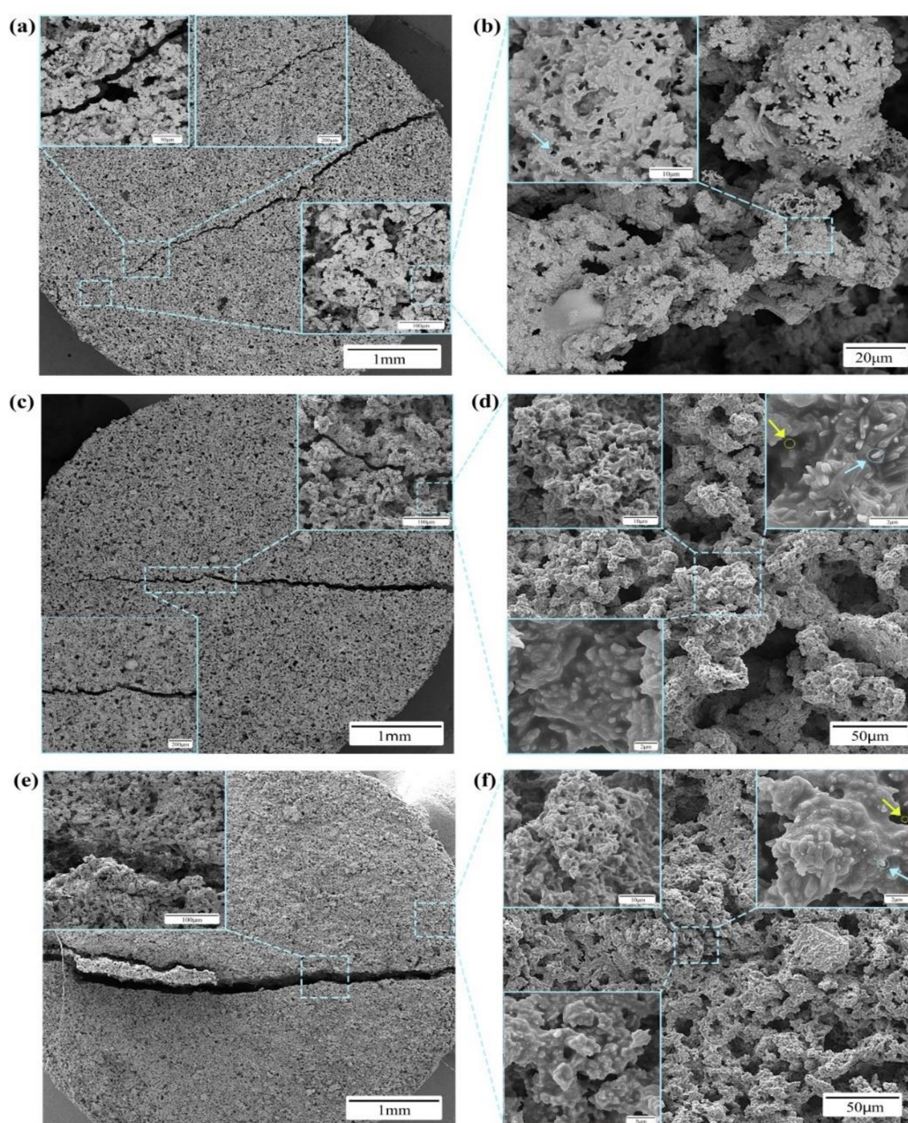
شکل ۹ الگوی تفرق اشعه ایکس نمونه‌های زینتر شده در جدول (۲) تصویر a) %.wt ۲۰، b) %.wt ۵۰ و c) %.wt ۸۰ هیدروکسی آپاتیت

نتایج مطالعات بر روی خواص مکانیکی (استحکام کششی قطری). میانگین نتایج استحکام کششی نمونه‌های زینتر شده طبق جدول ۲ در شکل ۱۰ آورده شده‌اند. با مقایسه نمونه‌های زینتر شده در $700\ ^{o}C$ می‌توان نتیجه گرفت که هرچه درصد وزنی شیشه بیشتر شده، استحکام نیز بالا رفته است. این امر را می‌توان به عملکر مناسب شیشه در جهت سهولت زینتر، نسبت داد. ماکسیمم استحکام کششی در بین نمونه‌های گفته شده، متعلق به نمونه ۱-۷۰۰-۲۰H به میزان ۰/۰۲ ± ۴/۸۷ مگاپاسکال، شامل ۲۰ wt.% هیدروکسی آپاتیت است که با توجه به مقدار شیشه این مقدار استحکام مطلوب است. مینیمم استحکام کششی متعلق به نمونه ۱-۷۰۰-۱۰۰H شامل ۱۰۰ wt.% هیدروکسی آپاتیت است که فاقد کمک زینتر بوده). روند افزایشی در استحکام را می‌توان با ثابت در نظر گرفتن شرایط زینتر و افزایش درصد وزنی شیشه مشاهده کرد. تغییرات نمونه‌ی ۰/۵-۷۰۰-۲۰H از روند گفته شده پیروی نمی‌کند و خطا در آزمون حساب می‌شود و دلیل این امر می‌تواند فشار کم پرس، اندازه پودر اولیه بسیار ریز و در نتیجه عدم فشرده شدن مناسب باشد. در هم شکستن تخلخل‌های پودر ریز در پرس سخت‌تر و نیازمند فشار بیشتری است و این امر ممکن موجب کاهش استحکام با توجه به فشار پرس کم باشد [36]. با بالا رفتن دما و زمان زینتر در نمونه‌ها با درصد وزنی یکسان هیدروکسی آپاتیت، استحکام افزایش می‌یابد به جز نمونه‌های دارای ۸۰ wt.% و ۱۰۰ wt.% هیدروکسی آپاتیت که به علت کم داشتن کمک زینتر (شیشه)، به طور مناسب زینتر نشده‌اند. نمونه‌ها حاوی ۲۰ wt.% هیدروکسی آپاتیت دارای بالاترین استحکام کششی در شرایط یکسانِ زینتر نسبت به سایر نمونه‌ها هستند. کاهش استحکام در نمونه‌های ۱-۶۰۰-۵۰H، ۰/۵-۶۵۰-۵۰H و ۱-۶۵۰۰-۵۰H می‌تواند به دلیل کاهش مقدار شیشه و زینتر نامناسب باشد. مقادیر کم استحکام به دلیل استفاده از کامپوزیت‌ها در ترمیم بافت نرم و عیوب سطحی، نگران کننده نیست. نمونه ۱-۷۰۰-۲۰H بهینه است و دارای بالاترین استحکام به دست آمده در در تحقیق حاضر است. در تحقیقی دیگر استحکام فشاری شیشه بوراتی زینتر شده در$575\ ^{o}C$ به مدت ٤٥ دقیقه به میزان ۰/۲±۱/۵ مگاپاسکال گزارش شده است [37]. با توجه به اینکه استحکام کششی نمونه با ۲۰ wt.% هیدروکسی آپاتیت و ۸۰ wt.% شیشه بوراتی، بالاتر از استحکام فشاری گزارش شده در تحقیق اشاره شده است، می‌توان دریافت که هیدروکسی آپاتیت تاثیر بسیاری در افزایش استحکام دارد.



شکل ۱۰ نتایج تست استحکام کششی قطری

تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی. شکل (۱۱) نشان دهنده تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی گرفته شده از سطح شکست و گسترش ترک در نمونه‌های ۱–۶۵۰–۲۰H و ۱–۷۰۰–۵۰H است. در تصاویر a، c و e شکست ترد کاملا مشخص است زیرا تغییر شکل مومسان حتی در مقیاس میکرو هم مشاهده نمی‌شود و با روی هم قرار دادن سطوح شکست، شکل قرص اولیه حاصل می‌شود [۳۸, p. 241] ، و به علت وجود تخلخل زیاد در نمونه‌ها ترک به صورت پیاپی مسیر خود را عوض می‌کند. عوض شدن پیاپی مسیر ترک باعث بالا رفتن استحکام نمونه می‌شود. از مقایسه تصاویر نمونه‌های ۱–۶۵۰–۲۰H و ۱–۷۰۰–۵۰H می‌توان دریافت که فاز آمورف در نمونه ۱–۶۵۰–۲۰H به میزان کمتر باعث زینتر و اتصال ذرات شده است. نتایج الگو تفرق اشعه ایکس نیز در راستای توضیح گفته شده است و در نمونه ۱–۷۰۰–۵۰H پیک هیدروکسی آپاتیت مشاهده نشده است. در حالی که در نمونه ۱–۶۵۰–۲۰H پیک هیدروکسی آپاتیت مشاهده شده است. این مشاهده می‌تواند به دلیل بالا رفتن دما و کم شدن گرانروی شیشه باشد، بنابراین سطح ذرات هیدروکسی آپاتیت آسان‌تر توسط شیشه تر و پوشیده می‌شود و سپس جریان ویسکوز ذکر شده در حین سرمایش به آمورف تبدیل می‌شود.



شکل ۱۱ تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی متعلق به نمونه‌های انتخاب شده. تصاویر a، b، c و d متعلق به دو نمونه از گروه ۱–۶۵۰–۲۰H و تصاویرe و f متعلق به نمونه ۱–۷۰۰–۵۰H. تصاویر a، c و e نشانگر مسیر رشد ترک، و b، d و f نمایشگر فاز آمورف و کریستالی (فاز کریستالی با فلش آبی و فاز آمورف با فلش زرد نشان داده شده‌اند)

طیف سنجی پلاسمای جفت شده‌ی القایی. طیف سنجی پلاسمای جفت شده‌ی القایی (ICP-OES) به منظور مشاهده‌ی میزان رهایش یون انجام شد. نمونه ۱-۷۰۰-H۲۰ (دارای بالاترین استحکام مکانیکی و wt.% ۲۰ هیدروکسی آپاتیت) به مدت ۷ روز در مایع شبیه سازی شده‌ی بدن (SBF) غوطه‌ور شد و سپس غلظت یون‌های رها شده در SBF توسط روش ICP-OES مشخص شد و در جدول (۳) گزارش شد. هنگامی که نمونه در SBF غوطه‌ور می‌شود، یون کلسیم (Ca^{2+}) به علت تخریب شدن ساختار شیشه بوراتی آزاد شده و با یون فسفات (PO_4^{3-}) موجود در SBF واکنش می‌دهد و آن را جذب می‌کند و باعث ایجاد کلسیم فسفات آمورف روی نمونه می‌شود [39]. لایه ذکر شده در نهایت به هیدروکسی آپاتیت که ساختار کریستالی دارد تبدیل می‌شود. وجود یون‌های منیزیم، سدیم، پتاسیم باعث بالا رفتن PH محلول SBF می‌شود. از سوی دیگر $B(OH)_3$ موجود در SBF بر اثر تشکیل یون بورات (BO_3^{3-}) دارای خاصیت اسیدی است [40] ,[19]. به منظور بررسی تغییرات در رفتار هیدروکسی‌آپاتیت در اثر کامپوزیت و زینتر کردن، غلظت یون فسفات و کلسیم ناشی از وجود نانوپودر هیدروکسی آپاتیت (٦٨ نانومتر) در SBF و میکروپودرهای زینتر شده توسط جرقه پلاسما در ۱۰۵۰ °C در SBF، با غلظت‌های گزارش شده در این تحقیق مقایسه شدند. غلظت یون کلسیم و فسفات موجودر در SBF در اثر حضور هیدروکسی آپاتیت زینتر شده بعد از ۷ روز به ترتیب ۹۰/۱۸ و ۲۷/۱ پی‌پی‌ام (از راست به چپ) گزارش شده‌اند [41]. و همچنین غلظت‌های گزارش شده در محلول SBF حاوی پودرهای نانوذره هیدروکسی آپاتیت بعد ۷ روز، ۲۱۰ پی‌پی‌ام برای یون کلسیم و ٤ پی‌پی‌ام برای یون فسفات است [27]. با توجه به تصاویر به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (FESEM) به طور واضح مشخص است که زینتر و اتصال ذرات هیدروکسی آپاتیت به کمک شیشه بوراتی (به عنوان کمک زینتر) انجام شده و خود ذرات هیدروکسی آپاتیت در زینتر به صورت جزیی شرکت کردند. ذرات هیدروکسی آپاتیت به صورت موضعی رشد کرده و از حالت نانوذره به تبدیل میکروذره شدند. با توجه به توضیح گفته شده و این امر که رهایش یون تحت تاثیر ترکیب، ساختار و اندازه ذرات است [42]، افزایش یون کلسیم در SBF در تحقیق حاضر، نسب به حالت زینتر کامل هیدروکسی آپاتیت توسط جرقه پلاسما می‌تواند به علت کمتر بودن اندازه و میزان رشدِ ذرات هیدروکسی آپاتیت و کامپوزیت شدن با شیشه بوراتی که به شدت تخریب‌پذیر است، باشد. همانطور که گفته شد غلظت یون کلسیم در SBF حاوی نانوذرات هیدروکسی آپاتیت در مقایسه با کامپوزیت‌های زینتر شده، بیشتر است و این نتیجه می‌تواند به علت میکروذره بودن و چسبندگی ذرات در کامپوزیت باشد. در نتیجه می‌توان با ساخت کامپوزیت شیشه بوراتی/هیدروکسی آپاتیت، میزان زیست فعالی هیدروکسی آپاتیت را بالا برد و نرخ و میزان رهایش کلسیم را افزایش داد. تخریب پذیری بالا در کنار غلظت بالای یون کلسیم ممکن است در ترمیم بافت نرم تاثیرگذار باشد [40]. غلظت یون فسفات در SBF بر خلاف روند غلظت یون کلسیم بوده و هرچه رهایش Ca^{2+} بیشتر بوده، مصرف یون PO_4^{3-} برای تشکیل لایه آمورف کلسیم فسفات بیشتر و در نتیجه غلظت آن در SBF کم‌تر است.

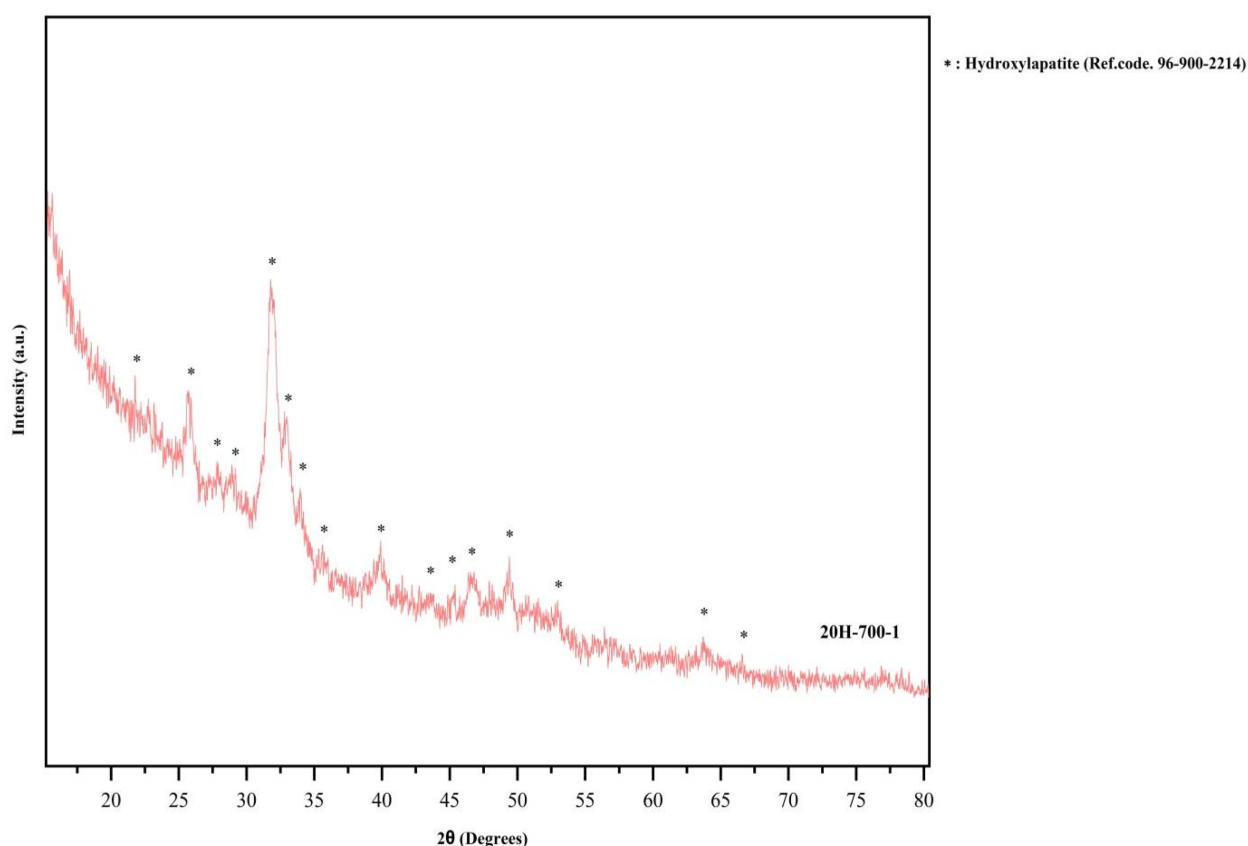
به هدف زیر نظر گرفتن تغییرات در رهایش یونی شیشه بوراتی در اثر کامپوزیت شدن با هیدروکسی آپاتیت، تفاوت غلظت یون کلسیم، بورات و فسفات موجود در SBF در مقایسه با تحقیقی دیگر از میکروفیبر (قطر ۳-۰,۲ میکرومتر) شیشه بوراتی 13-93B3 بعد از ۷ روز غوطه‌وری بررسی شد. غلظت‌های اشاره شده برای یون کلسیم، بورات و فسفات به ترتیب ۱۹۵/۳۹، ۲۵٦/۷٤ و ۳/۱ پی‌پی‌ام گزارش شده‌اند [40]. از مقایسه جدول (۳) با غلظت‌های ذکر شده می‌توان دریافت که رهایش یون کلسیم و بورات کامپوزیت‌های ساخته شده، کمتر بوده و دلیل آن می‌تواند کنترل رهایش بر اثر کامپوزیت کردن و کم کردن مقدار شیشه باشد. بیشتر بودنِ غلظت یون فسفات در محلول SBF حاوی کامپوزیت (۱۹/۵۹ پی‌پی‌ام)، نسبت به غلظت یون فسفات محلول SBF حاوی میکروفیبر شیشه بوراتی (۳/۱ پی‌پی‌ام) می‌تواند به دلیل وجود یون های فسفات در هیدوکسی آپاتیت موجود در کامپوزیت باشد. در نتیجه کاملا طبیعی است که غلظت یون فسفات در SBF شامل کامپوزیت از غلظت یون فسفات در SBF شامل شیشه بوراتی خالص بیشتر باشد. از طرف دیگر، رهایش یون کلسیم باعث استفاده یون فسفات و تشکیل هیدروکسی آپاتیت می‌شود. با توجه به این دو امر که ۱)

کامپوزیت زینتر شده است (به صورت قرص است) و سطح ویژه کمتری نسبت به میکروفیبر دارد و در نتیجه رهایش کمتری دارد و ۲) شیشه بوراتی در SBF سریع‌تر از هیدروکسی آپاتیت از تجزیه می‌شود، رهایش بیشتر یون کلسیم توسط میکروفیبر شیشه بوراتی خالص در مقایسه با کامپوزیت دارای هیدروکسی آپاتیت در ۷ روز اول، باعث استفاده بیشتر یون فسفات می‌شود. نتیجتا محلول SBF دارای کامپوزیت شیشه بوراتی/ هیدروکسی آپاتیت، یون فسفات بیشتری دارد.

به منظور تشخیص فازهای تشکیل شده در سطح نمونه‌ای که در SBF غوطه‌ور بوده،مطالعه XRD انجام شد. شکل (۱۲) نشان‌دهنده الگوی XRD برای نمونه ۱-۷۰۰-H۲۰ پس از ۷ روز غوطه‌وری در SBF است. همانطور که در شکل مشخص است پیک‌های موجود در ۲۶ و ۳۲=2θ مبنی بر وجود فاز هیدروکسی آپاتیت به عنوان تنها فاز متبلور شده روی سطح نمونه است.

جدول ۳ غلظت یون‌ها در مایع شبیه‌سازی شده‌ی بدن بعد از ۷ روز غوطه‌وری

یون	Ca^{2+}	Na^{+}	Mg^{2+}	K^{+}	BO_3^{3-}	PO_4^{3-}
غلظت در مایع شبیه‌ساز بدن (PPM)	۱۱۸/۷۳	۲٤٦٥/۸۹	۳٦/٥۱	٦۲٤/۷۹	٦۱/۹٤	۱۹/٥۹



شکل ۱۲ الگو تفرق اشعه ایکس نمونه ۱-۷۰۰-H۲۰ بعد از ۷ روز غوطه‌وری در مایع شبیه‌سازی شده‌ی بدن

نتیجه گیری

در تحقیق حاضر ترکیبات بوراتی توسط روش سنتز احتراقی در محلول ساخته شدند. به منظور بررسی پایداری، ترکیب سنتز شده در دمای ${}^{o}C$ ۴۰۰، تحت عملیات حرارتی در ${}^{o}C$ ۷۰۰ قرار گرفت. نتایج مطالعه الگوی تفرق اشعه ایکس بیانگر ساختار آمورفِ ترکیب سنتز شده در دمای ${}^{o}C$ ۴۰۰ بود. همچنین این ساختار در عملیات حرارتی انجام شده در دمای ${}^{o}C$ ۷۰۰، تمایل به کریستالی شدن از خود نشان داد. نتایج مطالعه طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه نمونه G400 (ترکیب سنتز شده در دمای ${}^{o}C$ ۴۰۰ که دارای ساختار آمورف است) وجود پیوندهای بور-اکسیژن در ساختار های BO_4 و BO_3 را تایید می‌کند. نتایج تست اندازه ذرات، توضیح می‌دهد که بالغ بر ۵۵ درصد ذرات در بازه ۲۰ تا ۴۰ نانومتر قرار دارند. نتایج تست‌های سمیت و مهاجرت سلولی انجام شده بر روی سلول‌های 3T3، تاثیر مثبت محتوای حاوی پودرهای G400 در رشد و مهاجرت سلولی را نسبت به گروه کنترل بیان می‌کند. بخش دیگر تحقیق به ساخت داربستی که هم با بافت نرم و هم بافت سخت پیوند مناسب برقرار می‌کند اختصاص داده شد. به این منظور نانوپودرهای G400 و نانوپودرهای سنتز شده هیدروکسی آپاتیت با درصدهای متفاوت وزنی کامپوزیت شدند و سپس در دماهای ${}^{o}C$ ۶۰۰، ${}^{o}C$ ۶۵۰ و ${}^{o}C$ ۷۰۰ به مدت زمان‌های ۰/۵ و ۱ ساعت زینتر شدند. نتایج XRD نشان می‌دهد که با بالا رفتن دما و زمان زینتر ساختار بلوری مشاهده نمی‌شود و دلیل این امر ایجاد سیال ویسکوز شیشه و سپس پوشاندن سطح ذرات هیدروکسی آپاتیت است. نتایج تست استحکام کششی قطری قرص‌های زینتر شده نشان می‌دهد با بالا رفتن درصد وزنی شیشه، دما و زمان زینتر، استحکام نیز بالاتر می‌رود. بالاترین استحکام ثبت شده، متعلق به نمونه ۱-۷۰۰-H۲۰، دارای wt.% ۲۰ هیدروکسی آپاتیت و wt.% ۸۰ شیشه بوراتی که در دمای ${}^{o}C$ ۷۰۰ به مدت ۱ ساعت زینتر شده، به مقدار ۰/۰۲± ۴/۸۷ مگاپاسکال بود. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی نقش شیشه بوراتی را به عنوان کمک زینتر که ذرات هیدروکسی آپاتیت را احاطه کرده و به هم متصل کرده، آشکار می‌کند. شکست ترد و میزان تخلخل بالا در تصاویر مشخص است. طیف سنجی پلاسمای جفت شده‌ی القایی بعد از ۷ روز غوطه‌وری در مایع شبیه سازی شده‌ی بدن، نشان‌دهنده افزایش رهایش یون کلسیم از نمونه کامپوزیتی ۱-۷۰۰-H۲۰ در مقایسه با هیدروکسی آپاتیت خالص زینتر شده، بود. از سوی دیگر رهایش یون‌های نمونه ۱-۷۰۰-H۲۰ نسبت به میکروفیبرهای شیشه بوراتی کمتر بوده است. نتایج ایکس آر دی نمونه ۱-۷۰۰-H۲۰ پس از ۷ روز غوطه‌وری در SBF نشان دهنده ایجاد فاز بلوری هیدروکسی آپاتیت روی سطح نمونه است. نتایج نشان می‌دهد کامپوزیت‌های ساخته شده کاندید مناسب برای برقراری پیوند با بافت سخت و نرم هستند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از دانشگاه فردوسی مشهد به دلیل حمایت مالی برای انجام این پژوهش قدردانی کنند.

مراجع

1. Zhao, S., et al., "Wound dressings composed of copper-doped borate bioactive glass microfibers stimulate angiogenesis and heal full-thickness skin defects in a rodent model", *Biomaterials*, Vol. 53, pp. 379-391, (2015).
2. Rizwan, M., Hamdi, M., Basirun, W. J., Kondoh, K., and Umeda, J., "Low pressure spark plasma sintered hydroxyapatite and Bioglass® composite scaffolds for bone tissue repair", *Ceramics International*, Vol. 44, pp. 23052-23062, No. 18, (2018).
3. Bellucci, D., et al., "Bioglass and bioceramic composites processed by Spark Plasma Sintering (SPS): Biological evaluation Versus SBF test", *Biomedical Glasses*, Vol. 4, pp. 21-31, No. 1, (2018).
4. Canillas, M., Pena, P., De Aza, A. H., and Rodríguez, M. A., "Calcium phosphates for biomedical applications", *Boletin de la Sociedad Espanola de Ceramica y Vidrio*, Vol. 56, pp. 91-112, No. 3. (2017).
5. Yaszemski, M. J., Payne, R. G., Hayes, W. C., Langer, R., and Mikos, A. G., "Evolution of bone transplantation:

Molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone", *Biomaterials*, Vol. 17, pp. 175-185, No. 2, (1996).

6. Spivak, J. M., and Hasharoni, A., "Use of hydroxyapatite in spine surgery", *European Spine Journal*, Vol. 10, pp. S197-S204, No. SUPPL. 2, (2001).
7. Bellucci, D., Desogus, L., Montinaro, S., Orrù, R., Cao, G., and Cannillo, V., "Innovative hydroxyapatite/bioactive glass composites processed by spark plasma sintering for bone tissue repair", *J Eur Ceram Soc*, Vol. 37, No. 4, pp. 1723-1733, (2017).
8. Burg, K. J. L., Porter, S., and Kellam, J. F., "Biomaterial developments for bone tissue engineering", *Biomaterials*, Vol. 21, No. 23, pp. 2347-2359, (2000).
9. Mollazadeh, S., Javadpour, J., and Khavandi, A., "In situ synthesis and characterization of nano-size hydroxyapatite in poly(vinyl alcohol) matrix", *Ceramics International*, Vol. 33, No. 8, pp. 1579-1583, (2007).
10. Tampieri, A., Celotti, G., Szontagh, F., and Landi, E., "Sintering and characterization of HA and TCP bioceramics with control of their strength and phase purity", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 8, No. 1, pp. 29-37, (1997).
11. Bellucci, D., Sola, A., and Cannillo, V., "Hydroxyapatite and tricalcium phosphate composites with bioactive glass as second phase: State of the art and current applications", *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, Vol. 104, No. 4, pp. 1030-1056, (2016).
12. Liao, C. J., Lin, F. H., Chen, K. S., and Sun, J. S., "Thermal decomposition and reconstitution of hydroxyapatite in air atmosphere", *Biomaterials*, Vol. 20, No. 19, pp. 1807-1813, (1999).
13. Liu, Y., and Shen, Z., "Dehydroxylation of hydroxyapatite in dense bulk ceramics sintered by spark plasma sintering", *J Eur Ceram Soc*, Vol. 32, No. 11, pp. 2691-2696, (2012).
14. Gerhardt, L. C., and Boccaccini, A. R., "Bioactive glass and glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering", *Materials*, Vol. 3, No. 7, pp. 3867-3910, (2010).
15. Hench, L. L., "The story of Bioglass®", in *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 17, No. 11, pp. 967-978, (2006).
16. Schuhladen, K., Wang, X., Hupa, L., and Boccaccini, A. R., "Dissolution of borate and borosilicate bioactive glasses and the influence of ion (Zn, Cu) doping in different solutions", *Journal of Non-Crystalline Solids*, Vol. 502, pp. 22-34, (2018).
17. Brown, R. F., *et al.*, "Effect of borate glass composition on its conversion to hydroxyapatite and on the proliferation of MC3T3-E1 cells", *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, Vol. 88, No. 2, pp. 392-400, (2009).
18. Zhou, J., *et al.*, "In vivo and in vitro studies of borate based glass micro-fibers for dermal repairing", *Materials Science and Engineering C*, Vol. 60, pp. 437-445, (2016).
19. Huang, W., Day, D. E., Kittiratanapiboon, K., and Rahaman, M. N., "Kinetics and mechanisms of the conversion of silicate (45S5), borate, and borosilicate glasses to hydroxyapatite in dilute phosphate solutions", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 17, No. 7, pp. 583–596, (2006).

20. Balasubramanian, P., Hupa, L., Jokic, B., Detsch, R., Grünewald, A., and Boccaccini, A. R., "Angiogenic potential of boron-containing bioactive glasses: in vitro study", *Journal of Materials Science*, Vol. 52, No. 15, pp. 8785-8792, (2017).
21. Balasubramanian, P., *et al.*, "Ion Release, Hydroxyapatite Conversion, and Cytotoxicity of Boron-Containing Bioactive Glass Scaffolds", *International Journal of Applied Glass Science*, Vol. 7, No. 2, pp. 206-215, (2016).
22. Guo, X., Xiao, P., Liu, J., and Shen, Z., "Fabrication of nanostructured hydroxyapatite via hydrothermal synthesis and spark plasma sintering", *Journal of the American Ceramic Society*, Vol. 88, No. 4, pp. 1026–1029, (2005).
23. Ali, A., *et al.*, "Studies on effect of CuO addition on mechanical properties and in vitro cytocompatibility in 1393 bioactive glass scaffold", *Materials Science and Engineering C*, Vol. 93, pp. 341-355, (2018).
24. Zaytsev, D., and Panfilov, P., "Deformation behavior of human enamel under diametral compression", *Materials Letters*, Vol. 136, pp. 130-132, (2014).
25. Horabik, J., Wiącek, J., Parafiniuk, P., Stasiak, P., Bańda, M., and Molenda, M., "Tensile strength of pressure-agglomerated potato starch determined via diametral compression test: Discrete element method simulations and experiments", *Biosystems Engineering*, Vol. 183, pp. 95-109, (2019).
26. Barfi Sistani, P., Mollazadeh Beidokhti, S., and Kiani-Rashid, A., "Crystallization Behavior and Mechanical Properties of In-situ Alumina-Zirconia Composite Bodies", *Advanced Ceramics Progress*, Vol. 4, No. Issue 3-4, pp. 36–42, (2018).
27. Kermani, F., Gharavian, A., Mollazadeh, A., Kargozar, S., Youssefi, A., and Vahdati Khaki, J., "Silicon-doped calcium phosphates; the critical effect of synthesis routes on the biological performance", *Materials Science and Engineering C*, Vol. 111, pp. 110828, (2020).
28. Kokubo, T., and Takadama, H., "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?", *Biomaterials*, Vol. 27, No. 15, pp. 2907-2915, (2006).
29. "CRC handbook of chemistry and physics: 1st student edition: Editor-in-chief: R C Weast. CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida and Wolfe Medical Publications, London. 1988. £19.95 ISBN 0-8493-0740-6", *Biochemical Education*, Vol. 17, No. 2, pp. 103, (1989).
30. Kumar, V., Manhas, M., Bedyal, A. K., and Swart, H. C., "Synthesis, spectral and surface investigation of novel CaMgB2O5:Dy3+ nanophosphor for UV based white LEDs", *Materials Research Bulletin*, Vol. 91, pp. 140-147, (2017).
31. Deliormanli, A. M., "In vitro assessment of degradation and mineralisation of V2O5 substituted borate bioactive glass scaffolds", *Materials Technology*, Vol. 29, No. 6, pp. 358–365, Nov. (2014).
32. Jung, S., "Borate Based Bioactive Glass Scaffolds for Hard and Soft Tissue Engineering", (2010).
33. Kermani, F., Mollazadeh, S., Kargozar, S., and Vahdati Khakhi, J., "Solution combustion synthesis (SCS) of theranostic ions doped biphasic calcium phosphates; kinetic of ions release in simulated body fluid (SBF) and reactive oxygen species (ROS) generation", *Materials Science and Engineering C*, Vol. 118, pp. 111533, (2021).

34. Gu, Y., Xiao, W., Lu, L., Huang, W., Rahaman, M. N., and Wang, D., "Kinetics and mechanisms of converting bioactive borate glasses to hydroxyapatite in aqueous phosphate solution", *Journal of Materials Science*, Vol. 46, No. 1, pp. 47-54, (2011).
35. Hu Y., and Miao, X., "Comparison of hydroxyapatite ceramics and hydroxyapatite/borosilicate glass composites prepared by slip casting", in *Ceramics International*, Vol. 30, No. 7, pp. 1787-1791, (2004).
36. Rekhi, S., Saxena, S. K., Atlas, Z. D., and Hu, J., "Effect of particle size on the compressibility of MgO", *Solid State Communications*, Vol. 117, No. 1, pp. 33-36, (2000).
37. Gu, Y., Huang, W., Rahaman, M. N., and Day, D. E., "Bone regeneration in rat calvarial defects implanted with fibrous scaffolds composed of a mixture of silicate and borate bioactive glasses", *Acta Biomaterialia*, Vol. 9, No. 11, pp. 9126-9136, (2013).
38. Paupler, P., "G. E. Dieter. Mechanical Metallurgy. 3rd ed., Mc Graw-Hill Book Co., New York 1986. XXIII + 751 p., DM 138.50, ISBN 0–07–016893–8", *Crystal Research and Technology*, Vol. 23, No. 2, Chap. 8, (1988).
39. Haghighi, F. D., Beidokhti, S. M., Najaran, Z. T., and Sahebian Saghi, S., "Highly improved biological and mechanical features of bioglass-ceramic/ gelatin composite scaffolds using a novel silica coverage", *Ceramics International*, Vol. 47, No. 10, pp. 14048-14061, (2021).
40. Liu, X., Rahaman, M. N., and Day, D. E., "Conversion of melt-derived microfibrous borate (13-93B3) and silicate (45S5) bioactive glass in a simulated body fluid", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 24, No. 3, pp. 583-595, (2013).
41. Gu, Y. W., Khor, K. A., and Cheang, P., "Bone-like apatite layer formation on hydroxyapatite prepared by spark plasma sintering (SPS)", *Biomaterials*, Vol. 25, No. 18, pp. 4127-4134, (2004).
42. Fathi, M. H., Hanifi, A., and Mortazavi, V., "Preparation and bioactivity evaluation of bone-like hydroxyapatite nanopowder", *Journal of Materials Processing Technology*, Vol. 202, No. 1–3, pp. 536–542, (2008)